

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Februar 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/015803 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 35/32, 35/28

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09080

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. August 2002 (13.08.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 39 783.6 14. August 2001 (14.08.2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): TRANS TISSUE TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Tucholskystrasse 2, 10117 Berlin (DE).

Veröffentlicht:
mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KAPS, Christian [DE/DE]; Arndtstrasse 21, 10965 Berlin (DE). SITTINGER, Michael [DE/DE]; Karl-Marx-Strasse 147D, 15831 Grossziethen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwalt: RICKER, Mathias; Jones, Day, Reavis & Pogue
Hochhaus am Park, Grüneburgweg 102, 60323 Frankfurt (DE).

(54) Title: CELL COMPOSITIONS FOR USE IN THE TREATMENT OF OSTEO-ARTHROSIS, AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: ZELLZUSAMMENSETZUNGEN ZUR BEHANDLUNG VON OSTEOARTHROSE, SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to the field of tissue engineering, especially the replacement of pathological tissue in joints (mainly bones and cartilage) and the treatment and the prevention of osteo-arthritic conditions in joints. For this purpose, the invention provides a method for producing cell compositions, namely the provision of mesenchymal cells and synovial fluid, as well as mixtures thereof for obtaining a cell composition. The inventive cell compositions are used in the treatment of osteo-arthritis and articular diseases or defects. The cell compositions are furthermore used for producing transplants. The invention also relates to methods for treating articular defects.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet des Tissue-Engineering, insbesondere den Ersatz von krankhaftem Gewebe in Gelenken (vorwiegend Knochen und Knorpel) und die Behandlung und Prävention von osteoarthrotischen Krankheitsbildern in Gelenken. Zu diesem Zweck werden Verfahren zur Herstellung von Zellzusammensetzungen offenbart, die die Bereitstellung von mesenchymalen Zellen und Synovialflüssigkeit, sowie deren Mischung zum Erhalt einer Zellzusammensetzung umfassen. Es werden Zellzusammensetzungen bereitgestellt, die zur Behandlung von Osteoarthrose und Gelenkerkrankungen bzw. -defekten verwendet werden. Des weiteren werden die Zellzusammensetzungen zur Herstellung von Transplantaten verwendet. schliesslich betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Behandlung von Gelenkdefekten.

WO 03/015803 A1

**Zellzusammensetzungen zur Behandlung von Osteoarthritis,
sowie Verfahren zu deren Herstellung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet des Tissue-Engineering, insbesondere den Ersatz von krankhaftem Gewebe in Gelenken (vorwiegend Knochen und Knorpel) und die Behandlung und Prävention von osteoarthrotischen Krankheitsbildern in Gelenken. Zu diesem Zweck werden Verfahren zur Herstellung von Zellzusammensetzungen offenbart, die die Bereitstellung von mesenchymalen Zellen und Synovialflüssigkeit, sowie deren Mischung zum Erhalt einer Zellzusammensetzung umfassen. Es werden Zellzusammensetzungen bereitgestellt, die zur Behandlung von Osteoarthritis und Gelenkerkrankungen bzw. -defekten verwendet werden. Des weiteren werden die Zellzusammensetzungen zur Herstellung von Transplantaten verwendet. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Behandlung von Gelenkdefekten.

20

Die Osteoarthritis ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit, die Mehrzahl aller Menschen im Alter über 65 ist davon betroffen. Daraus ergibt sich zwangsläufig eine sehr hohe klinische, gesundheitspolitische und volkswirtschaftliche Relevanz. Im Verlauf dieser primär degenerativen altersabhängigen Gelenkerkrankung kommt es zu einer schrittweisen fokalen Zerstörung der Gelenkoberfläche und einem reaktiven fehlregulierten regionalen Wachstum des angrenzenden und subchondralen Knochenstrukturen (Osteophyten). Folge sind Schmerzen und eingeschränkte Funktion und Beweglichkeit des betroffenen Gelenks. Systemische Faktoren, die die Entstehung einer Osteoarthritis beeinflussen sind Alter, Geschlecht, Gewicht, auftretende Osteoporose, eine familiäre Vorbelastung und me-

30

- 2 -

chanische Überbeanspruchung. Lokale Faktoren stellen die spezifische Gelenkform, Fehlstellungen, Traumen, sowie auf das Gelenk einwirkende biomechanische Faktoren dar. Trotz der eigentlichen degenerativen Genese kommt es auch bei der Osteoarthrose zu entzündlichen Veränderungen wie einer Synovitis (Entzündung der Gelenkinnenhaut), sowie zur Produktion von entzündungsfördernden biologischen Botenstoffen, z.B. von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Rubin, *J. Am. Osteopath. Assoc.*, 101, 2001, S. 2-5; van der Kraan und van den Berg, *Curr. Opin. Nut. Metab. Care*, 3, 2000, S. 205-211).

Die ablaufenden Veränderungen stellen eine Fehlregulation der Gewebehomöostase im Bereich der lasttragenden Knorpel- und Knochenstrukturen dar, d.h. es existiert eine Dysbalance zwischen degenerativen und reparativen Prozessen. Die Erkrankung ist dabei Folge von Störungen im Bereich des gesamten Gelenkes einschließlich des Knochens, der Muskulatur und der Gelenkinnervation, was schließlich zu einer mechanischen Überbeanspruchung und biochemisch vermittelten Zerstörung des betroffenen Gelenks führt.

Von Bedeutung ist weiterhin, daß es keine Heilung der Erkrankung Osteoarthrose gibt. Physiotherapeutische Massnahmen und schmerzlindernde, entzündungshemmende Medikamente (z.B. nicht-steroidale Antirheumatika) stellen häufig nur unzureichende symptomatische Therapien dar. Bekannte (konventionelle) orthopädische Verfahren wie *Debridement*, *Gelenkshaving*, *Microfracture* und *Drilling* sind ebenfalls nur unzureichend wirksam (s. Fitzgibbons, T.C., *AAOS Instructional Course Letters*, Vol. 48, 1999, S. 243-248). Bei ausgeprägten degenerativen Veränderungen bleibt häufig als finale Maßnahme nur der operativ-rekonstruktive Eingriff mit endoprothetischem Gelenkersatz, wobei letztgenanntes sicherlich eine sehr drastische und nach Möglichkeit zu vermeidende Maßnahme darstellt.

Vielversprechende neue Technologien bietet das *Tissue Engineering* durch die Möglichkeit einer Transplantation funktionell aktiver autologer Zellen, ggf. unter Zuhilfenahme formgebenden Biomaterialien. Mit Hilfe derartiger Technologien

- 3 -

kann neues Gewebe aktiv aufgebaut bzw. gezüchtet werden (s. Sittinger, M. *et al.*, *Biomaterials*, 1994, S. 451-456; Redlich, A. *et al.*, *J. Mat. Sci.* 10, 1999, S. 767-772).

5 So kann z.B. neu erzeugtes Gewebe durch Genmanipulation bzw. durch die Verwendung geeigneter Substrate und Faktoren mit immunsuppressiven Eigenschaften ausgestattet werden (s. DE-A 196 32 404), so dass keine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat mehr stattfindet, bzw. diese Reaktion abgeschwächt wird.

10 Die DE-C 44 31 598 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung eines Implantates aus Zellkulturen, das das Aufbringen der Zellen auf eine dreidimensionale Trägerstruktur und anschließende Perfusion mit einer Nährlösung bis zur mindestens teilweisen Ausbildung der interzellulären Matrix umfasst. Anschließend wird diese Struktur in den Patienten implantiert.

15

In ähnlicher Weise beschreibt die DE-C 43 06 661 die Herstellung von ummantelten formstabilen Trägerstrukturen, die anschließend transplantiert werden.

Schließlich beschreibt die DE-A 199 57 388 implantierbare Substrate zur Knorpelheilung und Knorpelprotektion, die in der Lage sind, ortsständige Zellen zu aktivieren und so die Heilung bzw. das Überwachsen des betroffenen Bereiches mit Zellen zu beschleunigen. Die verwendeten Substrate werden hier nach Aufbohren des Knochens, d.h. nach Schaffung von Verbindungskanälen zwischen Gelenkraum und Knochenmarkraum, bevorzugt in Form einer Paste, auf die betroffene Gelenkfläche aufgebracht.

20

25

Nachteilig bei den Verfahren, Zusammensetzungen und Implantaten des Standes der Technik im Hinblick auf die Heilung von Gelenkdefekten ist daher, dass diese häufig die Öffnung des Gelenkes bzw. umfangreiche mechanische Manipulationen am oder im Gelenk erfordern. Insbesondere gilt dies, wenn auf Trägerstrukturen anhaftende (und damit dreidimensionale) Implantate in das Gelenk eingeführt

30

- 4 -

werden müssen. Dies hat zur Folge, dass das Infektionsrisiko steigt und eine Heilung des betroffenen Gelenkes erschwert bzw. unmöglich gemacht wird. Des weiteren sind die bei der Perfusion eines Implantates vorherrschenden Bedingungen von den im Gelenk vorhandenen physiologischen Bedingungen verschieden.

5

Folglich besteht im Stand der Technik ein starkes Bedürfnis, eine möglichst schonende Möglichkeit zu entwickeln, osteoarthrotische Gelenkdefekte zu behandeln. Des weiteren besteht ein Bedürfnis, Zusammensetzungen zur Behandlung von Osteoarthrose und verwandten Pathologien bereitzustellen, die eine möglichst *in vivo*-nahe und effiziente Regeneration des betroffenen Gelenks bzw. Gelenkbereiches gestatten. Es besteht weiterhin ein Bedürfnis, Transplantate bereitzustellen, die unter *in vivo*-nahen Bedingungen kultiviert wurden und die ein hohes Maß an Biokompatibilität aufweisen. Schließlich besteht im Stand der Technik auch ein Bedürfnis, Zusammensetzungen bereitzustellen, die die Behandlung des Gelenkdefektes möglichst mit gering-invasiven Techniken gestatten.

15

Demzufolge ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Zusammensetzungen bereitzustellen, die eine schonende, *in vivo*-nahe und effiziente Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen, insbesondere von Osteoarthrose, ermöglichen. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung von Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, sowie in der Bereitstellung von Transplantaten, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen hergestellt werden. Schließlich besteht eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung von Behandlungsverfahren für Osteoarthrose und ähnliche degenerative Gelenkerkrankungen.

25

Diese und weitere Aufgaben werden durch die erfindungsgemäßen Verfahren und Zellzusammensetzungen gelöst.

30 Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Zellzusammensetzung umfassend die folgenden Schritte:

- 5 -

- a) Bereitstellung von mesenchymalen Zellen,
- b) Bereitstellung von Synovialflüssigkeit,
- c) Mischung von Synovialflüssigkeit und mesenchymalen Zellen zum Erhalt einer Zellzusammensetzung.

5

Die in Schritt a) beschriebene Bereitstellung der mesenchymalen Zellen umfasst in einer vorteilhaften Ausführungsform die Verwendung von frisch isolierten Zellen z.B. aus Knochenmark, Knorpel oder Blut. Die Zellen können z.B. auch als Gewebe bzw. Knorpel aus einem zunächst unbelasteten Bereich eines Gelenks
10 mittels Knorpelbiopsie entnommen werden. Aus dieser Knorpelbiopsie werden dann anschließend durch enzymatischen Verdau einzelne Knorpelzellen isoliert. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Zellen vor ihrer Bereitstellung in Zellkultur gehalten und vermehrt. Besonders bevorzugt ist hier die Haltung der Zellen in Suspensionskultur, so dass die spätere
15 Mischung, insbesondere die bevorzugte Mischung der mesenchymalen Zellen und der Synovialflüssigkeit *in vitro* (s. Schritt c), problemlos und ohne Anwendung mechanischer Verfahren erreicht werden kann. Die Bereitstellung der Synovialflüssigkeit (Schritt b) betrifft in einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Verwendung von eingefrorener Synovialflüssigkeit, die vor
20 der Verwendung aufgetaut wurde. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Synovialflüssigkeit vor dem Mischen (Schritt c) mit den mesenchymalen Zellen aus dem Gelenk entnommen, wobei eine Entnahme der Synovialflüssigkeit unmittelbar vor dem Mischen mit den mesenchymalen Zellen besonders bevorzugt ist. Die Mischung von mesenchymalen Zellen und Synovialflüssigkeit kann in
25 jeder beliebigen Reihenfolge erfolgen. Bezüglich der nach Mischung vorliegenden Zellzahl pro Volumeneinheit (Zelldichte) ist eine Dichte von einer Zelle/mL bis 40 Millionen Zellen/mL (End-Zelldichte) vorteilhaft, bevorzugt ist eine Zelldichte von 2 Millionen bis 30 Millionen Zellen/mL Flüssigkeit, besonders bevorzugt ist eine Zelldichte von 5 Millionen bis 15 Millionen Zellen/mL (End-Zelldichte).

30

- 6 -

Die vorliegende Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform auch ein Verfahren, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Blut, Spongiosa, Knorpel oder anderen mesenchymalen Geweben isoliert werden. Prinzipiell können hier alle Gewebe verwendet werden, die mesenchymale Zellen enthalten. Die Verfahren zur Isolierung dieser Zellen sind dem Fachmann bekannt (siehe Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., *Bone* 13(1) (1992), S. 81-88; Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I., *Bone* 13 (1992), S. 69-80; Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., *Science* 284 (1999), S. 43-147, Burmester, G.R., Menche, D., Merryman, P., Klein, M., Winchester, R., *Arthritis Rheum.* 26 (1983), S. 1187-1195; Sittering, M., Bujia, J., Minuth, W.W., Hammer, C., Burmester, G.R., *Biomaterials* 15 (1994), S. 451-456; Sittering, M., Reitzel, D., Dauner, M., Hierlemann, H., Hammer, C., Kastenbauer, E., Planck, H., Burmester, G.R., Bujia, J., *J. Biomed. Mat. Res.* 33 (1996), S. 57-63; sowie US-Patentschrift 5,486,359).

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen mesenchymale Vorläuferzellen oder mesenchymale Stammzellen sind. Die im Stand der Technik beschriebene Isolierung und Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen eröffnet prinzipiell die Möglichkeit, unter entsprechenden Kultur- und Entwicklungsbedingungen aus diesen omnipotenten Zellen jede körpereigene Zellform der unterschiedlichsten Zellpopulationen wie zum Beispiel Knorpel-, Knochen-, Haut-, Muskel-, Leber-, Nieren- und neuronale Zellen zu erzeugen. Die hohe Komplexität der für diese gewebespezifische Zellentwicklung relevanten Regelkreise, ethische Beweggründe, sowie die eingeschränkte Verfügbarkeit dieser Zellen kann jedoch erhebliche Probleme bereiten. Die erfindungsgemäße Verwendung von mesenchymalen Vorläuferzellen zur Heilung von Knochen- und Knorpeldefekten ist vorteilhaft, da derartige Zellen bereits in ihrer Entwicklung fortgeschritten und hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials in Bezug auf mesenchymale Zelltypen determiniert sind.

- 7 -

Mesenchymale Vorläuferzellen im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen auch mesenchymale Stammzellen. Sowohl mesenchymale Vorläufer- als auch mesenchymale Stammzellen weisen eine hohe Vermehrungskapazität auf (Caplan, A.I., *Clin. Plast. Surg.*, 21, 1994, S. 429-435) und sind unter geeigneten Kulturbedingungen bzw. nach entsprechender Manipulation, z.B. durch genetische Veränderung, ohne weiteres in der Lage, sich zu Zellen mesenchymaler Gewebe, also zu Knorpel, Knochen, Muskel, Fett- und Bindegewebe, zu entwickeln. Sie können aus dem Blut, Knochenmark und Fettgewebe adulter Spender gewonnen werden (Pittenger, M.F. *et al.*, *Science*, 1999, S. 143-147), so dass die ethisch umstrittene Verwendung von Embryonen, totipotenten embryonalen Zellen oder embryonalem Gewebe im Rahmen der vorliegenden Erfindung vermieden werden kann. Dies sichert die medizinisch/pharmazeutische Anwendbarkeit und Herstellbarkeit der erfindungsgemäßen Zellzusammensetzungen. Des weiteren basieren die aus dem Stand der Technik vorbekannten Verfahren des *Tissue Engineering* gewöhnlich auf der Vermehrung autologer Zellen, die anschließend, z.B. in Form eines ausgereiften Transplantates, wieder in den Patienten implantiert werden. Leider ist das Proliferationspotential derartiger Zellen begrenzt und eine Vermehrung über viele Zellpassagen *in vitro* reduziert wesentlich die funktionale Qualität der Zellen, was diese wiederum für die Transplantation weniger geeignet macht. Somit ist die erfindungsgemäße Verwendung von mesenchymalen Vorläuferzellen, die nicht den genannten Einschränkungen unterliegen, vorteilhaft.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen autolog sind. "Autolog" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass Zellen verwendet werden, die vor der Transplantation dem Transplantationspatienten selbst entnommen wurden. Dies bietet den erheblichen Vorteil - ähnlich wie bei einer Eigenblutspende vor einer größeren Operation, dass zur Transplantation bzw. Injektion genetisch und immunologisch (bezügl. der MHC-Histokompatibilität) auf den Empfänger perfekt abgestimmte Zellen bzw. Zellzusammensetzungen verwendet werden.

- 8 -

Die vorliegende Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform ferner Verfahren, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen heterolog sind. Sind zur Transplantation keine autologen Zellen erhältlich, so können
5 im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch heterologe Zellen bzw. Zellzusammensetzungen eingesetzt werden. "Heterolog" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass mesenchymale Zellen von einem anderen Individuum als dem Empfänger der Zellzusammensetzung zur Herstellung derselben verwendet werden.

10 Des weiteren betrifft die Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen in Zellkultur kultiviert werden. Die Kultivierung der mesenchymalen Zellen erfolgt dabei unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Zellkulturtechniken vor der Bereitstellung der Zellen, vorteilhaft ist ein Kulturzeitraum von 5 bis 50 Ta-
15 gen, bevorzugt sind 10 bis 40 Tage, besonders bevorzugt ist ein Zeitraum von 20 bis 25 Tagen.

Die Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, bei dem die Synovialflüssigkeit aus einem Gelenk erhalten wird. Die Synovialflüssig-
20 keit wird bevorzugt durch Punktion mit einer sterilen Nadel bzw. Spritze direkt aus dem Gelenk erhalten. Das Gelenk kann dabei Bestandteil eines lebenden Säugetiers (einschl. des Menschen) sein. Des weiteren kann die Synovialflüssigkeit aber auch aus toten Säugetieren bzw. Spendern gewonnen werden.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Zellzusammensetzung, bei dem die Synovialflüssigkeit autolog ist. "Autolog" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass Synovialflüssigkeit verwendet wird, die vor der Transplantation dem Transplantationspatienten selbst entnommen wurde. Dies bietet - wie bereits oben
30 in Bezug auf die mesenchymalen Zellen erwähnt - den erheblichen Vorteil, dass zur Transplantation bzw. zur Injektion genetisch und immunologisch perfekt auf

den Empfänger abgestimmte Zellen bzw. Zellzusammensetzungen verwendet werden können. Dies minimiert das Risiko einer Abstossungsreaktion des Empfängers, bzw. schließt diese weitgehend aus.

- 5 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren, bei dem die in Schritt b) bereitgestellte Synovialflüssigkeit synthetisch hergestellt wird. Die synthetische Herstellung von Synovialflüssigkeit bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine der natürlichen Synovialflüssigkeit nachempfundene Lösung hergestellt wird, wobei in einer bevorzugten Ausführungsform diese Lösung zellfrei ist. In
10 einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die synthetische Synovialflüssigkeit proteinfrei, wobei eine zell- und proteinfreie synthetische Synovialflüssigkeit besonders bevorzugt ist. Letzgenanntes stellt eine Synovialflüssigkeit dar, die, da sie im wesentlichen frei von Immunogenen ist, mit einer Vielzahl von Spendern kompatibel ist und deshalb universell eingesetzt werden kann.

15

- Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, bei dem die in Schritt b) bereitgestellte Synovialflüssigkeit chemisch, physikalisch oder biologisch modifiziert wird. Unter "chemischer Modifikation" soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Behandlung der Synovialflüssigkeit mittels vorwiegend
20 chemischer Verfahren verstanden werden. Beispielhaft für chemische Modifikationen seien hier Ionenaustausch-Chromatographie, Affinitätschromatographie, Ausfällen, Ausschütteln, fraktionierte Fällung, Versetzen mit bzw. Zugabe von Chemikalien, Einstellen des pH-Wertes mit Säure oder Base, Dialyse und Umsetzung der Synovialflüssigkeit mit Chemikalien genannt. Unter "physikalischer Modifi-
25 kation" soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Behandlung der Synovialflüssigkeit mittels vorwiegend physikalischer Verfahren verstanden werden. Beispielhaft für physikalische Modifikationen seien hier Zentrifugation, Wärme-/Kältebehandlung, Kochen, Abkühlen etc. genannt. Unter "biologischer Modifikation" soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Behandlung der Synovi-
30 alflüssigkeit mittels vorwiegend biologischer Verfahren verstanden werden. Beispielhaft für vorwiegend biologische Modifikationen seien hier die gentechnische

- 10 -

Veränderung von Zellen, die Zugabe/Entnahme von Zellen aus der Flüssigkeit und die Behandlung der Flüssigkeit mit Bakterien, Viren, Pilzen oder Mikroorganismen oder deren Stoffwechselprodukten genannt. Auch die Zugabe von biologisch aktiven Substanzen bzw. Molekülen ist als eine biologische Modifikation im Sinne der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Besonders bevorzugt ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Synovialflüssigkeit, bei der das nach Entnahme vorhandene Protein (z.B. durch Präzipitation und anschl. Zentrifugation) und/oder die nach Entnahme noch vorhandenen Zellen bzw. Zelltrümmer (z.B. durch Zentrifugation) entfernt werden, so dass in Schritt c) die mesenchymalen Zellen mit "geklärter" (d.h. weitgehend zell- und/oder proteinfreier) Synovialflüssigkeit gemischt werden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, bei dem die verwendeten mesenchymalen Zellen bipotent oder pluripotent sind. Im Gegensatz zu den bereits o.g. *omnipotenten* Zellen bzw. Zelllinien (Synonym: *totipotente* Zellen bzw. Zelllinien), die in hohem Maße embryonalen Charakter aufweisen und die sich in jedes gewünschte Gewebe ausdifferenzieren können, weisen die im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt verwendeten bipotenten oder pluripotenten Zellen bereits einen gewissen - wenn auch geringen - Differenzierungsgrad auf und können aus adulten Spendern gewonnen werden. Dies führt zu einer besseren Verfügbarkeit derartiger Zellen und einer problemloseren Entnahme. "Bipotent" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass die verwendeten mesenchymalen (Vorläufer-)Zellen sich zu zwei verschiedenen Zelltypen ausdifferenzieren können, während "pluripotent" bedeutet, dass mehr als zwei Zelltypen durch Differenzierung entstehen können. Die gegenwärtig diskutierten ethischen Bedenken bezügl. der Verwendung embryonaler Gewebe (deren Verfügbarkeit ohnehin eingeschränkt ist) bzw. von embryonalen Zellen in therapeutischen Verfahren bzw. bei der Herstellung von Medikamenten, treten bei der Verwendung von bi- oder pluripotenten Zellen zurück. Aus diesem Grunde basiert die vorliegende Erfindung auf der Verwendung von bi- oder pluripotenten mesenchymalen (Vorläufer-)Zellen, die im Sinne der vorlie-

genden Erfindung bi- oder pluripotente mesenchymalen Stammzellen (s.o.) umfassen, für die Geweberegeneration. Deren Potential zur Proliferation und Differenzierung ist prinzipiell ebenfalls nur wenig begrenzt, womit diese Zellart für das *Tissue Engineering* von Knorpel und Knochen von besonderem Interesse ist.

5

Weiterhin betrifft die Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, bei dem in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen mit Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, extrazellulären Matrixkomponenten oder chemotaktischen Faktoren behandelt werden. Das Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Vorläuferzellen kann unter Einfluß verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie z.B. EGF, PDGF, IGF oder FGF oder Faktoren, die aus der TGF- β Superfamilie stammen, unter definierten Kulturbedingungen oder auch *in vivo* beeinflusst werden. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzten Zytokine umfassen Interleukine, EGF, HGF, PDGF, FGF, sowie die TGF-Familie. Als extrazelluläre Matrixkomponenten seien hier beispielhaft die Kollagene genannt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können auch chemotaktische Faktoren wie z.B. VEGF, SDF-1, MDC, MIP, "steel factor", GM-CSF und Interleukine zur Behandlung der mesenchymalen Vorläuferzellen verwendet werden. Die Begriffe "behandeln" bzw. "Behandlung" sollen hier derart verstanden werden, dass die mesenchymalen Zellen den o.g. Substanzen bzw. Faktoren exponiert werden bzw. in Gegenwart derselben für einen gewissen Zeitraum inkubiert werden oder mit diesen gemischt werden.

10
15
20

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen gentechnisch verändert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform geschieht die gentechnische Veränderung der mesenchymalen Zellen durch Einführung eines Plasmids, das z.B. die Expression eines gewünschten Enzyms oder Strukturproteins ermöglicht, in die gegebenenfalls in Kultur befindlichen Zellen. Es ist jedoch auch möglich, Zellen zu verwenden, deren Chromosomen modifiziert wurden, beispielsweise durch chemische Agenzien oder Integrationsvektoren. Auf diese Weise lassen sich den Zellen der me-

25
30

- 12 -

senchymalen Zellzusammensetzung vorteilhafte Eigenschaften verleihen, die am Ort der späteren Behandlung (also bevorzugt im erkrankten Gelenk) positive Wirkungen erzeugen. Eine derartige Wirkung kann beispielsweise die Überexpression extrazellulärer Matrixproteine (Kollagene) sein, die zu einer vermehrten und beschleunigten Ansiedlung weiterer Zellen und Zellverbände an der erkrankten bzw. chirurgisch vorbehandelten Gelenkfläche führt.

Die Erfindung betrifft auch eine Zellzusammensetzung, erhältlich nach einem der o.g. Verfahren.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem der o.g. Verfahren zur Behandlung von humanen und tierischen Gelenkdefekten. Als Gelenkdefekte im Sinne der vorliegenden Erfindung gelten durch Prozesse entzündlicher und nicht-entzündlicher Genese ausgelöste pathologische Veränderungen eines Gelenkes.

15

Die vorliegende Erfindung beschreibt auch die Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem der o.g. Verfahren zur Injektion in den Gelenkspalt. In einer bevorzugten Ausführungsform geht man dabei von autologen mesenchymalen Zellen aus, die in autologer Synovialflüssigkeit als "natürliche Gelenkschmiere" in ein erkranktes Gelenk eingebracht werden. Die Applikation der mesenchymalen Zellen in den Gelenkspalt oder direkt in den Defekt ermöglicht die Ansiedelung teilungs- und reifungsfähiger Zellen im Defektbereich unter physiologischen Bedingungen zur Ausbildung und Regeneration von erneuertem Knorpel oder auch Knochen.

20

25

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem oben genannten Verfahren zur Injektion in den Gelenkdefekt. Neben der Injektion in den Gelenkspalt (s.o.) kann es unter Umständen im Rahmen der vorliegenden Erfindung aus topologischen Gründen vorteilhaft sein, die Zellzusammensetzung in den Defekt selbst zu injizieren.

30

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem oben genannten Verfahren zur interoperativen Behandlung von Gelenkdefekten. Der Begriff "interoperative Behandlung" soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung derart verstanden werden, dass die zwischen zwei Gelenkoperationen liegende Zeitspanne zur Behandlung der Gelenkdefekte unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen genutzt wird.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem der oben genannten Verfahren zur *in vitro*-Kultivierung von mesenchymalen Gewebetransplantaten. Die in den Schritten a) bis c) erhaltene Zellzusammensetzung wird - neben der direkten Verwendung zu Injektion in Gelenkdefekte und daraus resultierender *in vivo*-Behandlung dieser Defekte - in einer bevorzugten Ausführungsform zur *in vitro*-Kultivierung, d.h. zur Herstellung, von Transplantaten, die mesenchymale Zellen umfassen, verwendet. Derartige Transplantate werden in einer besonders bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung von dreidimensionalen Unterstützungsstrukturen kultiviert. Man geht dabei von biokompatiblen Materialien wie z.B. Polymervliesen (umfassend z.B. Polyglykole oder Polylactide), Kunststoffträgern oder keramischen bzw. mineralischen Materialien (z.B. Hydroxyapatit) aus, die als Unterstützungsstruktur dienen und von mesenchymalen Zellen besiedelt bzw. durchdrungen werden. Dies geschieht bevorzugt in einer Kammer, die die erfindungsgemäße Zellzusammensetzung und die Unterstützungsstruktur enthält, so dass die Unterstützungsstruktur von Lösung umgeben ist und die Zellen auf dieser anwachsen können. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind diese Unterstützungsstrukturen resorbierbar, so dass nach Anwachsen der mesenchymalen Zellen auf diesen Strukturen und Implantation in den Gelenkdefekt, die Unterstützungsstruktur sukzessive resorbiert wird. Das Transplantat selbst wird durch Kultivierung der mesenchymalen Zellzusammensetzung, die die aus einem Gelenk gewonnene oder synthetische oder modifizierte (s.o.) Synovialflüssigkeit umfasst, in Anwesenheit der Unterstützungsstruktur erhalten. Die Unterstützungsstruktur weist dabei in

einer bevorzugten Ausführungsform bereits die Form auf, die das fertige Transplantat aufweisen soll. Verfahren zur Herstellung derartiger Transplantate aus Zellen und Unterstützungs- bzw. Trägerstrukturen sind dem Fachmann bekannt und werden u.a. in der WO 94/20151 beschrieben. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Zellzusammensetzung umfassend Synovialflüssigkeit (bzw. modifizierte oder synthetische Synovialflüssigkeit) bietet den Vorteil, dass die Transplantate in einer Lösung kultiviert werden, die der Situation im Gelenk sehr ähnlich ist, so dass eine *in vivo*-nahe Kultivierung möglich ist. Letztgenanntes führt zu stabilen Transplantaten mit einem hohen Maß an Verträglichkeit für den Empfänger.

Die im Zusammenhang mit den vorstehend genannten Verfahren bzw. Verwendungen gebrauchten Begriffsdefinitionen gelten im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch für die im folgenden aufgeführten Zellzusammensetzungen und Behandlungsverfahren.

Die Erfindung betrifft des weiteren eine Zellzusammensetzung umfassend mesenchymale Zellen und Synovialflüssigkeit, sowie eine Zellzusammensetzung, bei der die mesenchymalen Vorläuferzellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Blut, Spongiosa, Knorpel oder anderen mesenchymalen Geweben isoliert werden.

Weiterhin betrifft die Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform eine Zellzusammensetzung, bei der die mesenchymalen Zellen mesenchymale Vorläuferzellen sind. "Mesenchymale Vorläuferzellen" umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch mesenchymale Stammzellen (s.o.).

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Zellzusammensetzung, bei der die mesenchymalen Zellen autolog sind, eine Zellzusammensetzung, bei der die mesenchymalen Zellen heterolog sind, eine Zellzusammensetzung, bei der die mesenchymalen Vorläuferzellen in Zellkultur kultiviert werden, eine Zellzusammensetzung, bei der die Synovialflüssigkeit aus einem Gelenk stammt, eine Zellzu-

- 15 -

sammensetzung, bei der die Synovialflüssigkeit autolog ist, sowie eine Zellzusammensetzung, bei der die Synovialflüssigkeit synthetisch hergestellt wird.

Weiterhin betrifft sie eine Zellzusammensetzung, bei der die Synovialflüssigkeit
5 chemisch, physikalisch oder biologisch modifiziert ist, eine Zellzusammensetzung, bei der die mesenchymalen Zellen pluripotent sind, eine Zellzusammensetzung, bei der die mesenchymalen Zellen mit Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, extrazellulären Matrixkomponenten oder chemotaktischen Faktoren behandelt wurden und eine Zellzusammensetzung, bei der die me-
10 senchymalen Vorläuferzellen gentechnisch verändert sind.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Transplantat, erhältlich durch die Kultivierung einer Zellzusammensetzung erhältlich durch eines der o.g. Verfahren, auf einem Trägermaterial. Die bevorzugten Trägermaterialien, die die Träger- bzw.
15 Unterstützungsstruktur (beide Begriffe sind im Rahmen der Erfindung synonym zu verstehen) des Transplantates bilden, wurden bereits oben genannt. Das Transplantat wird, wie bereits beschrieben, durch Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellzusammensetzung in Anwesenheit der Trägerstruktur (also in Lösung bzw. unter Perfusion) hergestellt.

20

Die in den unten stehend genannten Behandlungsverfahren beschriebenen Schritte, Stoffe und Zusammensetzungen sind gemäß den bereits oben verwendeten Definitionen und Begriffsbestimmungen auszulegen, sofern nichts anderes definiert ist.

25

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Behandlung von humanen und tierischen Gelenkdefekten, umfassend die folgenden Schritte:

- i) Entnahme von Synovialflüssigkeit aus einem Gelenk oder Herstellung von synthetischer Synovialflüssigkeit,
- 30 ii) Mischen der Synovialflüssigkeit mit mesenchymalen Zellen,

- 16 -

iii) Injektion der Mischung aus ii) in das Gelenk.

Die Entnahme von Synovialflüssigkeit in Schritt i) aus einem Gelenk geschieht vorzugsweise zerstörungsfrei unter Verwendung einer sterilen Nadel bzw. Spritze.

5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Synovialflüssigkeit entweder von lebenden Spendern stammen, oder aber von toten Säugetieren (eincl. Menschen) entnommen werden. Das Mischen der entnommenen Synovialflüssigkeit mit mesenchymalen Zellen in Schritt ii) kann in beliebiger Reihenfolge erfolgen. Bezüglich der nach Mischung vorliegenden Zellzahl pro Volumeneinheit (Zell-

10 dichte) ist eine Dichte von einer Zelle/mL bis 40 Millionen Zellen/mL (End-Zelldichte) vorteilhaft, bevorzugt ist eine Zelldichte von 2 Millionen bis 30 Millionen Zellen/mL Flüssigkeit, besonders bevorzugt ist eine Zelldichte von 5 Millionen bis 15 Millionen Zellen/mL (End-Zelldichte). Die Injektion der Mischung (Schritt iii) in das Gelenk des Empfängers sollte möglichst schonend und unter

15 sterilen Bedingungen erfolgen. Der Einsatz von minimal-invasiven Techniken ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung bezüglich aller Behandlungsschritte und -verfahren bevorzugt.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren, bei dem Schritt i) die Herstellung von

20 synthetischer Synovialflüssigkeit ist.

Die Herstellung von synthetischer Synovialflüssigkeit, sowie deren Vorteile, wurde bereits im Rahmen der vorliegenden Erfindung (s.o.) beschrieben.

25 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren, gekennzeichnet durch eine chemische, physikalische oder biologische Modifikation der Synovialflüssigkeit aus Schritt i) zwischen den Schritten i) und ii).

Die verschiedenen Möglichkeiten der Modifikation der Synovialflüssigkeit wurden bereits oben beschrieben, auf diese wird hiermit vollumfänglich Bezug ge-

30 nommen.

Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Behandlung von humanen und tierischen Gelenkdefekten, bei dem die mesenchymalen Zellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Blut, Spongiosa, Knorpel oder anderen mesenchymalen Geweben isoliert werden, ein Verfahren, bei dem die mesenchymalen Zellen autolog sind, ein Verfahren, bei dem die mesenchymalen Zellen heterolog sind, ein Verfahren, bei dem die mesenchymalen Zellen in Zellkultur kultiviert werden, ein Verfahren, bei dem die mesenchymalen Zellen mesenchymale Vorläuferzellen sind, sowie ein Verfahren, bei dem die Synovialflüssigkeit autolog ist.

10

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, bei dem die mesenchymalen Zellen bi- oder pluripotent sind, ein Verfahren, bei dem die mesenchymalen Zellen mit Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, extrazellulären Matrixkomponenten oder chemotaktischen Faktoren behandelt werden und ein Verfahren, bei dem die mesenchymalen Zellen gentechnisch verändert sind.

15

Die vorliegende Erfindung soll auch anhand der folgenden Ausführungsbeispiele erläutert werden. Die Ausführungsbeispiele sind nicht als limitierend anzusehen, sondern dienen der näheren Beschreibung der Erfindung.

20

AusführungsbeispieleBeispiel 1

5 Um eine Zellzusammensetzung zur Behandlung einer arthrotisch deformierten Gelenkoberfläche bereitzustellen, werden zunächst aus dem Knochenmark autologe mesenchymale Vorläuferzellen isoliert (siehe Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., *Bone* 13(1) (1992), S. 81-88; Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I., *Bone* 13 (1992), S. 69-80; Pittenger, M.F., Mackay, 10 A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., *Science* 284 (1999), S. 43-147, sowie US-Patentschrift 5,486,359). Die Vorläuferzellen werden über 24 Tage unter Zellkulturbedingungen mit DME-Medium (Biochrom KG, Berlin) supplementiert mit 10% autologem Serum (DME-autologS) kultiviert.

15

Dem erkrankten oder einem gesunden Gelenk wird mittels einer Aspirationsnadel 5-10 mL Synovialflüssigkeit entnommen, welche anschließend mit mesenchymalen Vorläuferzellen vermischt wird, so daß eine Zellkonzentration von 5 Millionen Zellen/mL erzielt wird. Hierzu werden die Vorläuferzellen mittels Trypsin von der 20 Kulturoberfläche gelöst und mit dem zweifachen Volumen DME-autologS versetzt und gezählt. Zum Erzielen einer Zellkonzentration von 5 Millionen Zellen pro ml Synovialflüssigkeit wird das entsprechende Volumen der Vorläuferzell-Suspension in ein Zentrifugen-Röhrchen (15 mL) überführt und bei 300g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und 25 das Zellpellet mittels einer serologischen Pipette (5 mL) in der entsprechenden Menge an Synovialflüssigkeit vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die so erhaltene Zellzusammensetzung wird direkt per Injektion in den Gelenkspalt injiziert. Die Applikation erfolgt durch mehrmalige Gabe der Zellzusammensetzung im Abstand von 2-3 Wochen.

30

Beispiel 2

Um eine Zellzusammensetzung zur Behandlung eines umschriebenen Defektes auf einer Gelenkoberfläche zu erhalten, werden zunächst aus dem Knochenmark autologe mesenchymale Vorläuferzellen isoliert (siehe Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., *Bone* 13(1) (1992), S. 81-88; Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I., *Bone* 13 (1992), S. 69-80; Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., *Science* 284 (1999), S. 43-147, sowie US-Patentschrift 5,486,359). Die Vorläuferzellen werden über 24 Tage unter Zellkulturbedingungen mit DME-Medium supplementiert mit 10% autologem Serum (DME-autologS) kultiviert.

Dem erkrankten oder einem gesunden Gelenk wird mittels einer Aspirationsnadel 5-10 mL Synovialflüssigkeit entnommen, welche mit mesenchymalen Vorläuferzellen vermischt wird, so daß eine Zellkonzentration von 5 Millionen Zellen/ml erzielt wird. Hierzu werden die Vorläuferzellen mittels Trypsin von der Kulturoberfläche gelöst und mit dem zweifachen Volumen DME-autologS versetzt und gezählt. Zum Erzielen einer Zellkonzentration von 5 Millionen Zellen pro mL Synovialflüssigkeit wird das entsprechende Volumen der Vorläuferzell-Suspension in ein Zentrifugen-Röhrchen (15 mL) überführt und bei 300g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird mittels einer serologischen Pipette (5 mL) vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren mit der entsprechenden Menge an Synovialflüssigkeit gemischt. Die so erhaltene Zellzusammensetzung wird anschließend direkt in den Defekt injiziert.

Beispiel 3

Zum Erhalt einer Zellzusammensetzung zur Behandlung eines osteochondralen Defektes in einem Gelenk werden zunächst aus dem Knochenmark autologe mesenchymale Vorläuferzellen (siehe Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., *Bone* 13(1) (1992), S. 81-88; Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I., *Bone* 13 (1992), S. 69-80; Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., *Science* 284 (1999), S. 43-147, sowie US-Patentschrift 5,486,359). Die Vorläuferzellen werden über 24 Tage unter Zellkulturbedingungen mit DME-Medium supplementiert und mit 10% autologem Serum (DME-autologS) kultiviert.

Dem erkrankten oder einem gesunden Gelenk wird mittels einer Aspirationsnadel 5-10 mL Synovialflüssigkeit entnommen und diese mit mesenchymalen Vorläuferzellen vermischt, so dass eine Zellkonzentration von 10 Millionen Zellen/mL erzielt wird. Hierzu werden die Vorläuferzellen mittels Trypsin von der Kulturoberfläche gelöst und mit dem zweifachen Volumen DME-autologS versetzt und anschließend gezählt. Zum Erzielen einer Zellkonzentration von 5 Millionen Zellen pro mL Synovialflüssigkeit wird das entsprechende Volumen der Vorläuferzell-Suspension in ein 15 mL fassendes Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei 300g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, um das Zellpellet mittels einer serologischen Pipette (5 mL) in der entsprechenden Menge an Synovialflüssigkeit vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die so erhaltene Zellzusammensetzung wird mit knocheninduzierenden Wachstumsfaktoren der Fibroblast Growth Factor Superfamilie oder dem Transforming Growth Factor- β (10 ng/ml Endkonzentration) vermischt und in den knöchernen Defekt injiziert. Nach Konsolidierung des knöchernen Defektes wird zur vollständigen Ausheilung des Knorpeldefektes eine Zellzusammensetzung umfassend mesenchymale Vorläuferzellen, wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben, in den Gelenkspalt injiziert.

Beispiel 4

Zur Behandlung eines chondralen Defektes des Gelenks wird zunächst aus dem unbelasteten Bereich des Gelenks eine Knorpelbiopsie entnommen. Aus der

5 Knorpelbiopsie werden durch enzymatischen Verdau Knorpelzellen isoliert (siehe Burmester, G.R., Menche, D., Merryman, P., Klein, M., Winchester, R., *Arthritis Rheum.* 26 (1983), S. 1187-1195; Sittering, M., Bujia, J., Minuth, W.W., Hammer, C., Burmester, G.R., *Biomaterials* 15 (1994), S. 451-456; Sittering, M., Reitzel, D., Dauner, M., Hierlemann, H., Hammer, C., Kastenbauer, E., Planck, H.,

10 Burmester, G.R., Bujia, J., *J. Biomed. Mat. Res.* 33 (1996), S. 57-63), in RPMI-Medium (Biochrom KG, Berlin) supplementiert und mit 10% autologem Serum (RPMI-autologS) in der Zellkultur vermehrt. Einem gesunden Gelenk wird mittels einer Aspirationsnadel 5-10 mL autologe Synovialflüssigkeit entnommen, welche

15 durch Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten bei Raumtemperatur von Zellen befreit wird. Der Überstand wird mit Knorpelzellen vermischt, so daß eine Zellkonzentration von 10 Millionen Zellen/mL erzielt wird. Hierzu werden die Knorpelzellen mittels Trypsin von der Kulturoberfläche gelöst und mit dem zweifachen Volumen RPMI-autologS versetzt und gezählt. Zum Erzielen einer Zellkonzentration von 10 Millionen Zellen pro ml Synovialflüssigkeit wird das entsprechende

20 Volumen der Knorpelzell-Suspension in ein 15 mL Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei 300g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mittels einer serologischen Pipette (5 mL) in der entsprechenden Menge an Synovialflüssigkeit vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die so erhaltene Zellzusammensetzung wird im Sinne einer ACT

25 (Autologe Chondrozyten-Transplantation) in den mit einem autologen Periostlappen übernähten Defekt injiziert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Zellzusammensetzung umfassend die folgenden Schritte:
 - 5 d) Bereitstellung von mesenchymalen Zellen,
 - e) Bereitstellung von Synovialflüssigkeit,
 - f) Mischung von Synovialflüssigkeit und mesenchymalen Zellen zum Erhalt einer Zellzusammensetzung.
- 10 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Blut, Spongiosa, Knorpel oder anderen mesenchymalen Geweben isoliert werden.
- 15 3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen mesenchymale Vorläuferzellen sind.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen autolog sind.
- 20 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen heterolog sind.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Zellen in Zellkultur kultiviert werden.
- 25 7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem die Synovialflüssigkeit aus einem Gelenk erhalten wird.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem die Synovialflüssigkeit autolog ist.
- 30

- 23 -

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, bei dem die in Schritt b) bereitgestellte Synovialflüssigkeit synthetisch hergestellt wird.
- 5 10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem in Schritt b) bereitgestellte Synovialflüssigkeit chemisch, physikalisch oder biologisch modifiziert wird.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem die mesenchymalen Vorläuferzellen bipotent oder pluripotent sind.
- 10 12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, bei dem in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Vorläuferzellen mit Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, extrazellulären Matrixkomponenten oder chemotaktischen Faktoren behandelt werden.
- 15 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, bei dem in Schritt a) bereitgestellten mesenchymalen Vorläuferzellen gentechnisch verändert werden.
- 20 14. Zellzusammensetzung, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13.
15. Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Behandlung von humanen und tierischen Gelenkdefekten.
- 25 16. Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Injektion in den Gelenkspalt.
- 30 17. Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Injektion in den Gelenkdefekt.

- 24 -

18. Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 zur interoperativen Behandlung von Gelenkdefekten.
- 5
19. Verwendung einer Zellzusammensetzung erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 zur *in-vitro* Kultivierung von mesenchymalen Gewebetransplantaten.
- 10
20. Zellzusammensetzung umfassend mesenchymale Zellen und Synovialflüssigkeit.
21. Zellzusammensetzung gemäß Anspruch 20, bei der die mesenchymalen Zellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Blut, Spongiosa, Knorpel oder anderen mesenchymalen Geweben isoliert werden.
- 15
22. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 oder 21, bei der die mesenchymalen Zellen mesenchymale Vorläuferzellen sind.
- 20
23. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, bei der die mesenchymalen Zellen autolog sind.
24. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, bei der die mesenchymalen Zellen heterolog sind.
- 25
25. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 24, bei der die mesenchymalen Zellen in Zellkultur kultiviert werden.
26. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 25, bei der die Synovialflüssigkeit aus einem Gelenk stammt.
- 30

- 25 -

27. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 26, bei der die Synovialflüssigkeit autolog ist.
28. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 27, bei der die
5 Synovialflüssigkeit synthetisch hergestellt wird.
29. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 28, bei der die Synovialflüssigkeit chemisch, physikalisch oder biologisch modifiziert ist.
- 10 30. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 29, bei der die mesenchymalen Zellen bipotent oder pluripotent sind.
31. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 30, bei der die mesenchymalen Zellen mit Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, extrazellulären Matrixkomponenten oder chemotaktischen
15 Faktoren behandelt werden.
32. Zellzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31, bei der die mesenchymalen Zellen gentechnisch verändert sind.
- 20 33. Transplantat erhältlich durch die Kultivierung einer Zellzusammensetzung erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 auf einem Trägermaterial.
- 25 34. Verfahren zur Behandlung von humanen und tierischen Gelenkdefekten, umfassend die folgenden Schritte:
- i) Entnahme von Synovialflüssigkeit aus einem Gelenk oder Herstellung von synthetischer Synovialflüssigkeit,
 - ii) Mischen der Synovialflüssigkeit mit mesenchymalen Zellen,
30
 - iii) Injektion der Mischung aus ii) in das Gelenk.

- 26 -

35. Verfahren gemäß Anspruch 34, bei dem Schritt i) die Herstellung von synthetischer Synovialflüssigkeit ist.
- 5 36. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 oder 35, gekennzeichnet durch eine chemische, physikalische oder biologische Modifikation der Synovialflüssigkeit aus Schritt i) zwischen den Schritten i) und ii).
- 10 37. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 36, bei dem die mesenchymalen Zellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Blut, Spongiosa, Knorpel oder anderen mesenchymalen Geweben isoliert werden.
38. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 37, bei dem die mesenchymalen Zellen mesenchymale Vorläuferzellen sind.
- 15 39. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 38, bei dem die mesenchymalen Zellen autolog sind.
- 20 40. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 39, bei dem die mesenchymalen Zellen heterolog sind.
41. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 40, bei dem die mesenchymalen Zellen in Zellkultur kultiviert werden.
- 25 42. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 41, bei dem die Synovialflüssigkeit autolog ist.
43. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 42, bei dem die mesenchymalen Zellen bipotent oder pluripotent sind.

- 27 -

44. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 43, bei dem die mesenchymalen Zellen mit Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, extrazellulären Matrixkomponenten oder chemotaktischen Faktoren behandelt werden.

5

45. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 44, bei dem die mesenchymalen Zellen gentechnisch verändert sind.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/EP 02/09080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/32 A61K35/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SKOOG V ET AL: "The effect of growth factors and synovial fluid on chondrogenesis in perichondrium." SCANDINAVIAN JOURNAL OF PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY AND HAND SURGERY / NORDISK PLASTIKKIRURGISK FORENING 'AND! NORDISK KLUBB FOR HANDKIRURGI. SWEDEN 1990, vol. 24, no. 2, 1990, pages 89-95, XP001117413 ISSN: 0284-4311	1,2,4-8, 14,20, 21,23-27
Y	* das ganze Dokument, im besonderen Tabelle 2, Abbildung 6, s. 94 rechte Spalte*	3,9-13, 15-19, 22, 28-32, 34-45
	---	-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2002

Date of mailing of the international search report

18/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krueger, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/09080

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 51317 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC ;UNIV CASE WESTERN RESERVE (US)) 19 November 1998 (1998-11-19)	33
Y	*das ganze Dokument, im besonderen: Zusammenfassung, Ansprüche*	3,9-13, 15-19, 22, 28-32, 34-45
X	NEIDEL ET AL.: "Stellenwert der Synovialanalyse für die Prognose der Matrixsynthese transplanterter Chondrozyten" ORTHOPÄDIE, vol. 29, 2000, pages 158-163, XP002216902 * das ganze Dokument, im besonderen Abbildung 1*	1,2,4-8, 14,20, 21,23-27
A	BRUDER S P ET AL: "MESENCHYMAL STEM CELLS IN BONE DEVELOPMENT, BONE REPAIR, AND SKELETAL REGENERATION THERAPY" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, US, US, vol. 56, no. 3, 1994, pages 283-294, XP000865959 ISSN: 0021-9525 the whole document	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/09080

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9851317	A	19-11-1998	AU	7481098 A		08-12-1998
			EP	0989855 A1		05-04-2000
			WO	9851317 A1		19-11-1998
<hr/>						

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/09080

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A61K35/32 A61K35/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SKOOG V ET AL: "The effect of growth factors and synovial fluid on chondrogenesis in perichondrium." SCANDINAVIAN JOURNAL OF PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY AND HAND SURGERY / NORDISK PLASTIKKIRURGISK FORENING 'AND! NORDISK KLUBB FOR HANDKIRURGI. SWEDEN 1990, Bd. 24, Nr. 2, 1990, Seiten 89-95, XP001117413 ISSN: 0284-4311	1, 2, 4-8, 14, 20, 21, 23-27
Y	* das ganze Dokument, im besonderen Tabelle 2, Abbildung 6, s. 94 rechte Spalte*	3, 9-13, 15-19, 22, 28-32, 34-45
	---	-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Oktober 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/11/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krueger, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ nationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/09080

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 51317 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC ; UNIV CASE WESTERN RESERVE (US)) 19. November 1998 (1998-11-19)	33
Y	*das ganze Dokument, im besonderen: Zusammenfassung, Ansprüche*	3,9-13, 15-19, 22, 28-32, 34-45
X	NEIDEL ET AL: "Stellenwert der Synovialanalyse für die Prognose der Matrixsynthese transplanterter Chondrozyten" ORTHOPÄDIE, Bd. 29, 2000, Seiten 158-163, XP002216902 * das ganze Dokument, im besonderen Abbildung 1*	1,2,4-8, 14,20, 21,23-27
A	BRUDER S P ET AL: "MESENCHYMAL STEM CELLS IN BONE DEVELOPMENT, BONE REPAIR, AND SKELETAL REGENERATION THERAPY" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, US, US, Bd. 56, Nr. 3, 1994, Seiten 283-294, XP000865959 ISSN: 0021-9525 das ganze Dokument	1-45

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/09080

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9851317 A	19-11-1998	AU 7481098 A	08-12-1998
		EP 0989855 A1	05-04-2000
		WO 9851317 A1	19-11-1998
